采用表面增强拉曼光谱技术快速检测脐橙果皮中抑霉唑残留

张　莎[1,2]，刘木华[1,2]，陈金印[2]，赵进辉[1,2*]

（1. 江西农业大学 工学院/江西省现代农业装备重点实验室，江西南昌 330045；
2. 江西省果蔬采后处理关键技术及质量安全协同创新中心，江西南昌 330045）

摘　要：由于采后处理过程中脐橙保鲜剂抑霉唑易通过果皮渗进果肉中残留，不慎食用后会对人体产生危害。因此，本研究探索一种基于表面增强拉曼光谱技术（Surface-Enhanced Raman Spectroscopy，SERS）的脐橙果皮中抑霉唑残留的快速检测方法。首先对SERS检测条件进行优化，分别确定了最优的检测条件为反应时间2 min，金胶加入量400 μL，NaBr作为电解质溶液且加入量为25 μL。基于以上最优检测条件，以自适应迭代惩罚最小二乘法（Adaptive Iterative Reweighted Penalized Least Squares，air PLS）、air PLS+归一化、air PLS+基线校正、air PLS+一阶导数、air PLS+标准正态变量（Standard Normal Distribution，SNV）和air PLS+多元散射校正（Multiplicative Scatter Correction，MSC）处理后的6组光谱数据为研究对象，分别采用这6种光谱预处理法建立支持向量回归（Support Vector Regression，SVR）模型并对预测性能进行比较后发现，air PLS方法所建立模型的预测集相关系数（Coefficient of the Determinant for the Prediction Set，R_p）最大，预测集均方根误差（Root-Mean-Square Error of Prediction，RMSEP）最小。对光谱数据进行主成分分析（Principal Component Analysis，PCA）特征提取，选择前7个主成分得分作为SVR预测模型的输入值。采用SVR、多元线性回归（Multiple Linear Regression，MLR）和偏最小二乘回归（Partial Least Squares Regression，PLSR）三种建模方法分析比较其对应的预测性能，其中SVR模型的预测集R_p可高达0.9156，预测集RMSEP为4.8407 mg/kg，相对标准偏差（Relative Standard Deviation，RPD）为2.3103，表明基于SVR算法对脐橙表面抑霉唑残留的预测值越接近实测值，越能有效提高模型预测准确性。试验结果表明，利用SERS结合PCA及SVR建模，可实现对脐橙果皮中抑霉唑残留的快速检测。

关键词：脐橙；抑霉唑；表面增强拉曼光谱；支持向量回归；多元线性回归；偏最小二乘回归

中图分类号：O433.4　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：202106-SA002

引用格式：张莎，刘木华，陈金印，赵进辉．采用表面增强拉曼光谱技术快速检测脐橙果皮中抑霉唑残留[J]. 智慧农业(中英文), 2021, 3 (4): 42-52.

ZHANG Sha, LIU Muhua, CHEN Jinyin, ZHAO Jinhui. Rapid detection of imazalil residues in navel orange peel using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Smart Agriculture, 2021, 3 (4): 42-52. (in Chinese with English abstract)

1　引　言

赣南脐橙作为中国赣州地理标志性产品，带动了当地经济的发展，深受当地政府重视，该产地也成为了全国最大的脐橙生产区[1]。脐橙在贮藏过程中易受病原菌侵害，导致其腐烂，造成经

收稿日期：2021-06-02　修订日期：2021-06-24

基金项目：江西省教育厅科技计划资助项目（GJJ160350）

作者简介：张 莎（1996—）女，硕士研究生，研究方向为拉曼光谱检测与分析。E-mail：1175794826@qq.com。

*通信作者：赵进辉（1978—），男，博士，教授，研究方向为拉曼光谱检测与分析。电话：13732963151。E-mail：9115328@ qq.com。

济损失[2]。目前，采用化学保鲜剂是柑橘类水果储存中病害防治相对成熟、效果较好的保鲜方式。抑霉唑（Imazalil，IMZ）和咪鲜胺等化学保鲜剂主要用来防治脐橙的青霉病和绿霉病[2,3]，但该类保鲜剂长期使用容易产生耐药性，进而引起保鲜效率的折损。不少商贩为了达到保鲜效果，在贮藏过程中加大保鲜剂的使用剂量，造成脐橙中抑霉唑过量残留。而且，即便是少量的抑霉唑残留也会使动物和人类的肝脏损伤，甚至可能致癌[4,5]。为此，中国规定了脐橙中抑霉唑保鲜剂残留的最大限量为5 mg/kg[6]。为了确保脐橙的食用安全品质，检测脐橙果皮中抑霉唑的残留量具有重要的实际意义。

目前常用的抑霉唑残留检测方法主要有气相色谱法（Gas Chromatography，GC）[7,8]、高效液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）[9,10]、质谱法（Mass Spectrometry，MS）[7,9]和超高效液相色谱法（Ultra-Performance Liquid Chromatography，UPLC）[10]等。以上方法主要优点在于再现性好、精确性和敏感性高，但所需要的仪器设备较昂贵[11]，试验操作繁琐，耗时长，无法实现对抑霉唑残留量的快速检测，在实际应用中受到一定的限制。因此，有必要探索一种可以快速检测脐橙果皮中抑霉唑残留的方法。

表面增强拉曼光谱技术（Surface-Enhanced Raman Spectroscopy，SERS）是一种当入射激光照射到金或银等粗糙金属表面时，在其表面会激发出等离子体并在粗糙金属粒子的覆盖区域内产生共振，使其表面产生比普通拉曼信号强4～11个数量级的信号强度的技术，该方法具有方便快捷、灵敏度高、稳定性好、操作简单和可适用于现场分析的优点[12,13]。Zhao等[11]采用SERS技术制备了柔性衬底，对苹果表面抑霉唑残留进行原位检测，在苹果上检测到的最低浓度可达0.073 mg/kg。该研究表明，SERS方法具有较高的灵敏度。抑霉唑在水果采后保鲜的过程起到非常重要的作用。为避免由于脐橙果皮抑霉唑残留问题对人体造成伤害，采用SERS技术检测脐橙果皮中抑霉唑残留具有重要意义。本研究主要以脐橙为对象，采用自适应迭代惩罚最小二乘法（Adaptive Iterative Reweighted Penalized Least Squares，air PLS）对含不同浓度的抑霉唑的脐橙果皮的SERS光谱进行预处理，并选择前7个主成分得分值作为支持向量回归（Support Vector Regression，SVR）模型的输入值，建立SVR预测模型对脐橙果皮中的抑霉唑残留量进行预测。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

便携式拉曼光谱仪系统主要包括QE65Pro型拉曼光谱仪（美国海洋光学公司）、785 nm激光器、光纤和采样附件等；DXR™显微拉曼光谱仪（美国赛默飞世尔科技有限公司）；磁力搅拌器（LC-DMS-H，上海力辰邦西仪器科技有限公司）；数控超声波清洗器（KQ-500DE型，昆山市超声仪器有限公司）；电子天平（FA2004，上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；实验室超纯水机（美国TeLedyne水质公司）。

2.2 材料与试剂

本研究所用脐橙购于江西农业大学水果店。研究所用试剂包括三水合四氯金酸（$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$≥49.0%，西格玛奥德里奇贸易有限公司），抑霉唑乳油（500 g/L，江苏龙灯化学有限公司），抑霉唑标准品（IMZ，纯度≥99%，阿拉丁），柠檬酸三钠（$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$，99%，西陇化工股份有限公司），溴化钙（$CaBr_2$，≥98%，阿拉丁），溴化钠（NaBr，99%，阿拉丁），氯化钙（$CaCl_2$，分析纯，纯度98%），氯化钠（NaCl，99.5%，西陇化工股份有限公司），以及实验室自制超纯水。

2.3 样本制备

（1）抑霉唑原液配制。取100 μL的抑霉唑乳油（500 g/L）置于100 mL容量瓶中，加入

62.5 mL的超纯水均匀混合，得到800 mg/L的抑霉唑原液。

（2）抑霉唑工作溶液制备。取不同体积的乳油（500 g/L）用超纯水稀释成不同质量浓度的抑霉唑工作溶液（250～500 mg/L）。

（3）样本制备。将脐橙的果皮用超纯水洗净，晾干后将果皮切成若干个面积为1.5 cm×1.5 cm的脐橙小块，对其进行称重（a，单位：g）。

在条件优化试验中，将切好的脐橙小块浸泡于抑霉唑溶液（800 mg/L）中，90 s后捞出晾干，再对其称重（b，单位：g），得到含40.34 mg/kg抑霉唑的脐橙果皮样本。

在定量试验中，将切好的65个脐橙小块浸泡于抑霉唑溶液（250～500 mg/L）中，90 s后捞出晾干，再对其称重（b，单位：g），得到含抑霉唑的脐橙果皮样本（1.43～40.81 mg/kg）。未浸泡在抑霉唑中的脐橙果皮样本为空白脐橙果皮样本。其中，在条件优化试验部分与定量试验部分中，a为脐橙果皮的初始重量，b为浸泡抑霉唑溶液且晾干后的重量；b−a可得到脐橙果皮中抑霉唑的重量，g；设c为抑霉唑溶液的浓度，mg/kg，则（b−a）×c为脐橙果皮抑霉唑实际吸收抑霉唑的重量，mg；（b−a）×c/b则为每块脐橙果皮上实际吸收的抑霉唑的浓度，mg/kg。

（4）金胶制备。取3 mL浓度为1%的$HAuCL_4$溶液于150 mL的烧杯中，再慢慢加入47 mL超纯水，混合均匀，将混合液放至磁力搅拌器中加热到沸腾。沸腾后立即加入2 mL浓度为1%的柠檬酸三钠溶液，并搅拌8 min后，冷却至室温形成金胶溶液备用[14,15]。

（5）电解质溶液制备。取0.1 g $CaBr_2$、0.55 g $CaCl_2$、5.14 g NaBr和2.9 g NaCl分别置于棕色的50 mL容量瓶中，先加入少量水溶解，再定容至50 mL，可分别得到0.01 mol/L的$CaBr_2$溶液、0.1 mol/L $CaCl_2$溶液、1 mol/L NaBr和1 mol/L NaCl溶液。

2.4 拉曼光谱采集

抑霉唑标准品拉曼光谱采集。取适量的抑霉唑标准品于载玻片上，用DXR™显微拉曼光谱仪采集其拉曼光谱。本研究主要分析400～1800 cm^{-1}波段的拉曼光谱。

定性试验中脐橙果皮SERS光谱采集。将400 μL纳米金胶和25 μL NaBr溶液充分混合后喷到含40.34 mg/kg抑霉唑的脐橙小块上，待金胶与抑霉唑分子反应2 min后，采集其SERS光谱。每个优化条件下，设置5个平行样，取其平均值为该条件下的拉曼光谱。

定量试验中脐橙果皮SERS光谱采集。将400 μL纳米金胶和25 μL NaBr溶液充分混合后喷到含抑霉唑的脐橙小块（1.43～40.81 mg/kg）上，采集脐橙的SERS光谱。每个浓度下的脐橙样本采集5条拉曼光谱作为平行样，取其平均值作为该样本的拉曼光谱。

其中，DXR™显微拉曼光谱仪的参数设置为：激光能量5 mW，激发波长780 nm，物镜的放大倍数选择10倍，采集曝光时间10 s，预览采集时间10 s，样品曝光10次，背景曝光16次。便携式拉曼光谱仪的参数设置为：积分时间为60 s，平均次数为2，平滑度为1。

2.5 SERS检测试验方法

2.5.1 定性检测

通过比较空白脐橙果皮和含抑霉唑的脐橙果皮（40.34 mg/kg）的SERS光谱，得到983和1047 cm^{-1}波段作为特征峰鉴别脐橙果皮中是否残留抑霉唑。因此，本研究通过比较983和1047 cm^{-1}波段处的SERS信号强度来确定最佳的检测条件。

为研究不同反应时间对SERS强度的影响，将400 μL金胶与25 μL的NaBr溶液混合均匀后喷洒到含40.34 mg/kg抑霉唑的脐橙样本上，分别采集反应时间为0、2、4、6和8 min时的SERS光谱。通过比较983和1047 cm^{-1}波段处的

SERS信号强度与反应时间的关系来确定抑霉唑分子与金胶的最佳反应时间。

为研究不同金胶加入量对SERS强度的影响，分别将80、240、400、560和720 μL的金胶与25 μL的NaBr溶液混合均匀后喷洒到含40.34 mg/kg抑霉唑的脐橙样本上，反应2 min后采集其SERS光谱。通过比较983和1047 cm^{-1}波段处的SERS信号强度与金胶加入量的关系来确定最佳的金胶量。

为研究不同电解质溶液的加入量对SERS强度的影响，将400 μL金胶分别与25 μL的$CaBr_2$溶液、$CaCl_2$溶液、NaBr溶液和NaCl溶液混合均匀后喷洒到含40.34 mg/kg抑霉唑的脐橙样本上，反应2 min后采集其SERS光谱。通过比较983和1047 cm^{-1}波段处的SERS信号强度与电解质溶液（$CaBr_2$、$CaCl_2$、NaBr和NaCl）的直方图来确定最佳的电解质溶液。

为了研究不同NaBr加入量对SERS强度的影响，将400 μL金胶分别与0、10、15、20、25、30 μL的NaBr溶液混合均匀后喷洒到含40.34 mg/kg抑霉唑的脐橙样本上，反应2 min后采集其SERS光谱。通过比较983和1047 cm^{-1}波段处的SERS信号强度与NaBr加入量的折线图来确定最佳的电解质溶液。

2.5.2　定量检测

将400 μL金胶与25 μL的NaBr溶液混合均匀后喷洒到含抑霉唑的脐橙样本（1.43~40.81 mg/kg）上，反应2 min后采集其拉曼光谱。得到65个含抑霉唑的脐橙样本，从中随机挑选35个建立预测模型，剩余的30个脐橙样本则用作预测集，用来评估该模型的预测性能。

2.6 抑霉唑理论拉曼光谱计算

为对比理论数据结果和试验结果之间的一致性，采用密度泛函理论（Density Functional Theory，DFT）计算方法对抑霉唑分子的振动归属进行理论运算分析。

抑霉唑的3D分子结构采用Gauss View 5.0构造，Gaussian 09W软件计算理论抑霉唑分子的拉曼光谱频率，在计算时采用DFT方法中的B3LYP/6-31G（d，p）基组。C、H、Cl、N和O原子也采用6-31G（d，p）基组，在Gaussian 09中显示计算结果。对拉曼位移用该机组相对应的校正系数（0.961）校正。其中基组为该电子体系内轨道的数学描述，“6”解释为内层轨道的函数数量；而一个基组中含3个高斯函数（Gaussian Type Orbital， GTO），每一个Slater函数（Slater Type Orbital， STO）由6个GTO展开，“31”解释为两组STO描述的价层的轨道；“d”和“p”分别是对分子中的C、Cl、N、O原子和H原子做的极化函数[16]。

3　结果与分析

3.1 抑霉唑标准品的拉曼光谱分析

抑霉唑的分子式为$C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$，由1个烯丙氧基连接1个二氯苯基官能团组成。优化后得到的抑霉唑分子结构如图1所示，主要包括C、C-H、C=C-H、C-O、N=C-N、C-N、N-C-H和C-N-C等基团。

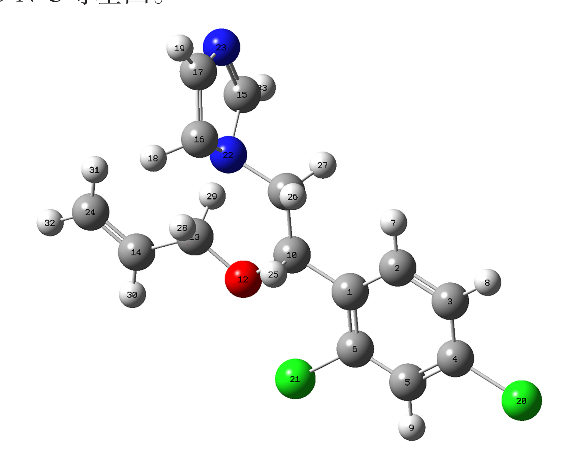


图1　优化的抑霉唑分子结构

Fig. 1 Optimized molecular structure of IMZ

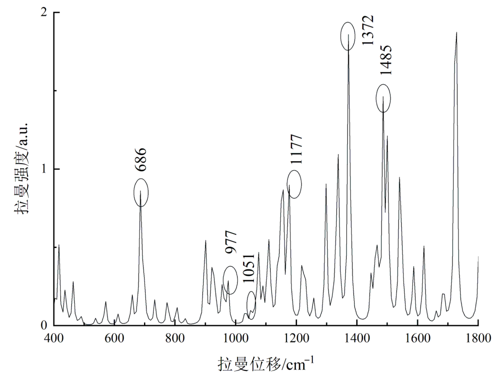
图2（a）为理论计算的抑霉唑拉曼光谱，图2（b）为实际测得的抑霉唑标准品的拉曼光谱。通过对比两者的特征峰归属可发现，1176和1378 cm^{-1}波段处特征峰的拉曼信号强度较弱。这可能是由于这两个位移处分别在苯环上有微弱的面外弯曲和面内弯曲振动所引起。结合表1和

图2可得，抑霉唑标准品在690 cm^{-1}波段处的特征峰是由于苯环弯曲振动、CH_2面内摇摆、C-C面外弯曲、二氯苯基面外弯曲共同作用产生的；983 cm^{-1}波段处的振动可能是由于苯环弯曲振动、二氯苯基上C=N-C和C-N-C与C=C-N的弯曲振动共同作用产生；1041 cm^{-1}处的峰是由C-H剪式振动、C=C-H面外弯曲振动和CH_2面内弯曲振动共同作用产生。图2中理论计算光谱与标准品的拉曼光谱的特征峰匹配可发现，最小偏差为0，最大偏差为10。这可能是由于实际测量拉曼光谱的标准品为固体粉末，其之间存在相互作用力，而理论计算时的形态为理想的气态单分子，忽略了分子间作用力。基于此，理论计算的抑霉唑拉曼光谱很好地印证了实测的抑霉唑拉曼光谱的正确性，可以将实测的抑霉唑标准品拉曼光谱作为后续分析脐橙表面抑霉唑残留的参考依据。

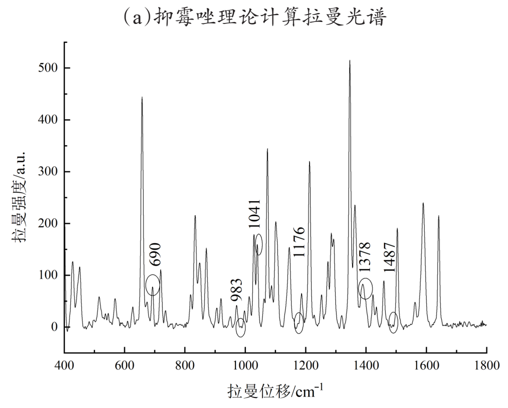
表1 抑霉唑理论计算和标准品拉曼特征峰归属

Table 1 Raman peak attribution analysis of IMZ theoretical calculation and standard

标准品拉曼特征峰/cm^{-1}	理论拉曼特征峰/cm^{-1}	主要特征峰归属
690	686	苯环弯曲振动、CH_2面内摇摆、C-C面外弯曲、二氯苯基面外弯曲
983	977	苯环弯曲振动、二氯苯基上C=N-C和C-N-C与C=C-N的弯曲振动
1041	1051	C-H剪式振动、C=C-H面外弯曲振动、CH_2面内弯曲
1176	1177	C-C和C-O伸缩振动、C-H弯曲振动、苯环面外弯曲
1378	1372	N=C-N剪式振动、C-N对称伸缩、N-C-H剪式振动、苯环面内弯曲
1487	1487	C-N-C非对称伸缩、C-H面外弯曲、CH_2面外弯曲、CH_2剪式振动



(a)抑霉唑理论计算拉曼光谱



(b)抑霉唑标准品拉曼光谱图

图2 理论计算和标准品抑霉唑拉曼光谱

Fig. 2 Raman spectrum of theoretical calculation and standard substance IMZ

3.2 脐橙果皮中抑霉唑的SERS光谱分析

由图3可知，含抑霉唑的脐橙样本在983与1047 cm^{-1}波段处有区别于空白脐橙样本的拉曼特征峰。而抑霉唑标准品拉曼光谱在983与1041 cm^{-1}波段处均有特征峰，并在1041 cm^{-1}波段处有6 cm^{-1}的偏差，这可能是由于脐橙本身较强的背景峰影响导致的。因此，可以将这两处特征峰作为鉴别脐橙果皮中是否含抑霉唑的依据。

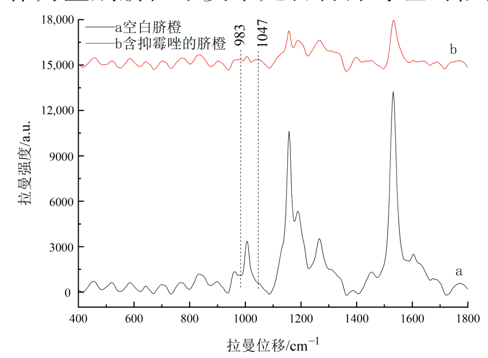


图3 两组样本的平均SERS光谱

Fig. 3 Average SERS spectra of two groups of samples

3.3 样本SERS强度检测条件优化

由图4可知脐橙与金胶和NaBr溶液混合物

的反应时间不同，SERS信号强度不同。随着反应时间的增长，983和1047 cm^{-1}处的SERS强度均呈现出持续下降的趋势。产生这种现象的原因可能是刚开始吸附时，脐橙果皮的抑霉唑与金胶及NaBr溶液充分混合，使得该活性位点处的SERS信号得以迅速增强[17]。吸附时间过长会使金胶纳米粒子凝聚过度从而产生沉淀，降低抑霉唑与金胶结合的效率[18]。但是由于0 min的反应时间在实际操作中比较困难，故本研究选择2 min作为最优的反应时间。

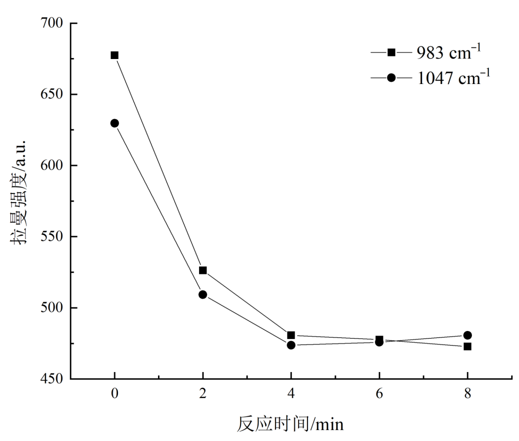


图4 反应时间对SERS强度的影响

Fig. 4 Effect of reaction time on SERS intensity

SERS主要是通过分子吸附在金和银等粗糙金属的表面，从而使局部表面产生等离激元共振效应，对SERS强度起到增强的效果[19]。由图5可看出，随着金胶加入量的增大，983与1047 cm^{-1}波段处的拉曼特征峰强度呈先减小后增大再次减小的趋势。出现这种现象可能的原因是当金胶的量增大到一定程度时，有更多的抑霉唑分子吸附在纳米金胶颗粒的表面，使得983 cm^{-1}的特征峰在560 μL时的SERS信号达到最强，1047 cm^{-1}的特征峰在400 μL时的SERS信号达到最强。而在金胶加入量为400 μL时983 cm^{-1}波段处的SERS强度为次强点，仅次于560 μL处的SERS强度。综合考虑，本研究选择最优金胶加入量为400 μL。

电解质溶液对SERS强度的增强效果取决于离子对金胶表面状态的影响及离子对金胶纳米粒

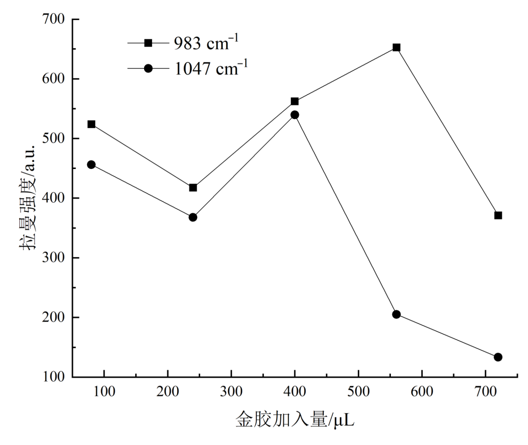


图5 金胶加入量对SERS强度的影响

Fig. 5 Effects of gold colloid volume on SERS intensity

子的吸附能力[20]。图6可看出，金胶与$CaBr_2$的混合溶液在983 cm^{-1}波段处的SERS强度达到最强，金胶与NaBr的混合溶液在1047 cm^{-1}波段处的SERS强度最强。出现此现象的原因可能是由于氯离子的盐析能力大于溴离子的盐析能力，导致溴离子与金属粒子的表面络合能力强于氯离子，结果表明含溴离子的化合物（NaBr和$CaBr_2$）对SERS强度的增强效果明显大于含氯离子的化合物（NaCl和$CaCl_2$）对SERS强度的增强效果[21]。其次，NaBr在983 cm^{-1}特征峰处的SERS强度仅次于$CaBr_2$。综合考虑，本研究选择NaBr作为最优的电解质溶液。

在纳米金胶溶液中加入不同量的NaBr，可

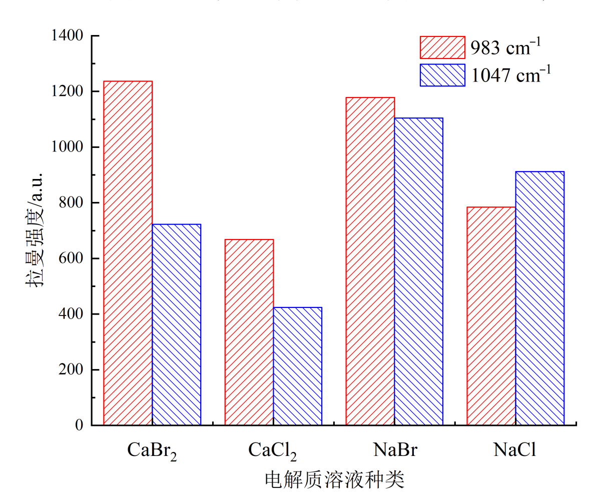


图6 不同电解质溶液对SERS强度的影响

Fig. 6 Effects of electrolyte solution on SERS intensity

能会对SERS信号产生影响，因此有必要对电解质溶液的加入量进行优化[22]。从图7可看出，当NaBr加入量为10 μL时，1047 cm^{-1}波段处的SERS信号强度达到局部最高。当NaBr加入量增大到25 μL时，983 cm^{-1}波段处的SERS强度达到最高点，而1047 cm^{-1}波段处虽未达到最强，却仅次于最强点。可能的原因是当卤族元素的量高到足以聚合时，使局部的电磁场增强，从而增强SERS信号。而当加入过量NaBr后，会加剧金纳米粒子的聚集从而发生沉淀[21]，进而降低SERS信号强度。因此本试验确定了NaBr溶液的最佳加入量为25 μL。

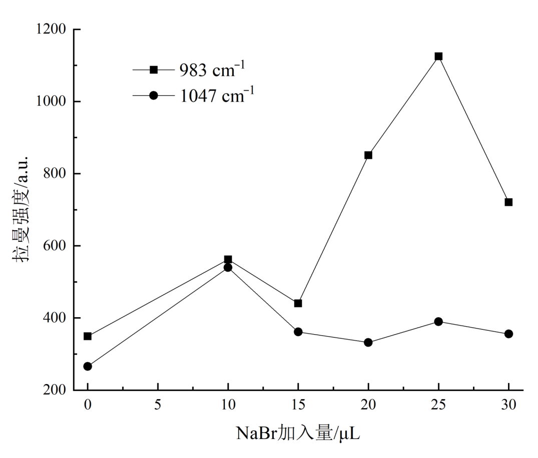


图7 NaBr加入量对SERS强度的影响

Fig. 7 Effects of NaBr volume on SERS intensity

3.4 光谱预处理

为减少光谱分析过程中受到噪声、基线漂移等因素干扰，在建立模型之前有必要对原始光谱进行光谱预处理[23]。目前常用的光谱预处理方法主要有air PLS、归一化、基线校正、一阶导数、二阶导数、标准正态变量（Standard Normal Distribution，SNV）和多元散射校正（Multiplicative Scatter Correction，MSC）等[23,24]。其中基线校正、一阶导数和二阶导数的作用主要是扣除漂移或背景对结果的影响，在改变了原始数据相关性的变化趋势的同时，也有效提高了某些位置光谱的相关性。在光谱数据分析时，样本的误差表现在无规则分布或样本颗粒大小各异，而MSC和SNV可以消除该误差对光谱分析结果的影响，还能够提高原始光谱与预处理后光谱之间的相关性。归一化能够消除由于尺寸差异过大对分析结果带来的误差[23]。因此，本研究以自适应迭代惩罚最小二乘法（Adaptive Iterative Reweighted Penalized Least Squares，air PLS）、air PLS+归一化、air PLS+基线校正、air PLS+一阶导数、air PLS+SNV和air PLS+MSC处理后的6组光谱数据为研究对象，分别采用这6组光谱预处理法建立SVR模型并进行预测性能的比较。

由表2可知，air PLS、air PLS+SNV、air-PLS+MSC三组光谱预处理方法所建立模型的训练集相关系数（Coefficient of Determination for the Training Set，R_T）的值均达到0.96以上。且三者的训练集均方根误差（Root-Mean-Square Error of Training set，RMSEC）的值相差不大，稳定在3.7附近。然后对该三种方法的预测集相关系数（Coefficient of the Determinant for the Prediction Set，R_P）进行比较，air PLS方法建立模型预测的预测集R_P为最大，预测集均方根误差（Root-Mean-Square Error of Prediction，RMSEP）为最小。因此，本研究最终选择air PLS作为脐橙表面抑霉唑残留的SVR预测模型的光谱预处理方法。

表2 6组光谱预处理方法对SVR模型的评价

Table 2 Evaluation of six spectral preprocessing methods for SVR model

预处理	R_T	RMSEC	R_P	RMSEP
air PLS	0.9620	3.8165	0.9156	4.8407
air PLS+归一化	0.7955	9.1730	0.7890	9.0271
air PLS+基线校正	0.9105	6.4134	0.9010	5.7491
air PLS+一阶导数	0.9461	5.5340	0.8049	8.0074
air PLS+SNV	0.9702	3.7241	0.6737	9.2194
air PLS+MSC	0.9751	3.2697	0.6729	9.1564

3.5 PCA特征提取

建立模型之前对光谱数据进行主成分分析（Principal Component Analysis，PCA）特征提

取。一般来说，主成分分析时主成分的方差贡献率达到90%以上即可作为主要光谱信息的特征[25]。由表3可知，前7个主成分的累计方差贡献率已达91.94%。因此，选择前7个主成分的得分值作为SVR预测模型的输入值。

表3 前7个主成分因子的方差贡献率

Table 3 The variance contribution rates of the first 7 principal component factors

主成分因子	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	47.52	47.52
2	17.56	65.08
3	9.84	74.92
4	7.52	82.44
5	4.66	87.10
6	2.80	89.90
7	2.04	91.94

3.6 预测模型的建立以及预测性能分析

为评价模型的预测精度和效果，采用了SVR、多元线性回归（Multiple Linear Regression，MLR）和偏最小二乘回归（Partial Least Squares Regression，PLSR）三种建模方法进行分析比较。其中，SVR预测模型的类型为epsilon SVR，核函数为径向基核函数，epsilon值为0.1，惩罚因子C值为10。

通常选择R_P、RMSEP和相对标准偏差（Relative Standard Deviation，RPD）的值来评价模型性能。其中，R_P和RMSEP分别用来解释真实值与预测值的相关性和精确度的能力。R_P越大，RMSEP越小则说明该模型的拟合程度越好，准确性越高[25]。RPD值则是对模型预测能力的评估，RPD值越大（不小于1），说明预测效果越好，其预测结果越接近实测值[25]。

由表4可得，基于SVR建立模型预测的R_P为SVR、MLR、PLSR三者中的最大，RMSEP为最小。因此，基于SVR算法对脐橙表面抑霉唑残留的预测值越接近实测值，能有效提高模型预测准确性。其中，最低检出限为1.43 mg/kg（国家于《GB 2763-2019 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中规定抑霉唑在脐橙中残留最大限量为5 mg/kg）。

表4 不同建模方法对脐橙果皮中抑霉唑残留量的预测结果的影响

Table 4 Influence of different modeling methods on prediction results of IMZ residues in navel orange peel

评价指标	SVR	MLR	PLSR
R_P	0.9156	0.9052	0.9064
RMSEP/(mg·kg^{-1})	4.8407	5.3996	5.2774
RPD	2.3103	2.3460	1.9830

为进一步做预测分析，在随机挑选35个样本建立模型之后，剩余的30个样本作为预测集进行验证，即脐橙果皮抑霉唑残留浓度分别为38.93、30.45、21.53、14.63、9.24和4.05 mg/kg的样本，实测的真实值与预测值之间的关系如图8，R_P为0.9156，RMSEP为4.8407 mg/kg。

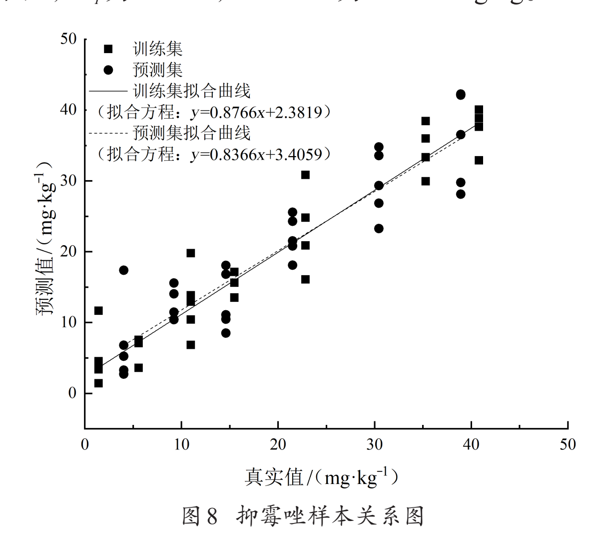


图8 抑霉唑样本关系图

Fig. 8 IMZ samples relation diagram

4 结 论

本研究探索了SERS技术在检测脐橙果皮中抑霉唑农药残留的可行性。首先通过对比983和1047 cm^{-1}两处波段的SERS强度，进行抑霉唑残留的SERS检测条件优化，分别确定了最优的检测条件（2 min的反应时间，400 μL的金胶加入量，NaBr作为电解质溶液且添加量为25 μL）。在最优条件下，对含抑霉唑的脐橙果皮拉曼光谱

采用6组不同的光谱预处理方法，分别对这6组光谱所建立模型的预测性能进行对比，最终采用air PLS的光谱预处理方法。经过PCA的特征提取，选择前7个主成分得分作为脐橙果皮抑霉唑残留的SVR预测模型的输入值。最后SVR预测模型的R_p可达0.9156，RMSEP为4.8407 mg/kg，RPD为2.3103。由于本研究所采用的计算实际残留浓度的方法为称重法，挥发时间不一致容易造成称量误差，进而影响最终实际残留浓度的计算。因此实际残留浓度的计算方法还有待进一步改善。研究结果表明，SERS技术可实现脐橙果皮抑霉唑残留的快速检测。

参考文献：

[1] 唐剑鸿. 新媒体视域下赣南脐橙网络营销策略优化研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(8): 229-230.
TANG J. Research on the optimization of Gannan navel orange network marketing strategy from the perspective of new media[J]. Food Research and Development, 2021, 42 (8): 229-230.

[2] 王文军, 曾凯芳, 刘晓佳, 等. 不同保鲜剂对柑橘果实贮藏品质的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(4): 110-116.
WANG W, ZENG K, LIU X, et al. Effects of different preservatives on storage quality of citrus fruits[J]. Food and Machinery, 2017, 33 (4): 110-116.

[3] 陈婷, 蔡艳, 段凯文, 等. 脐橙贮藏保鲜研究进展[J]. 农产品加工, 2019(20): 83-85.
CHEN T, CAI Y, DUAN K, et al. Research progress of navel orange storage and preservation[J]. Agricultural Products Processing, 2019 (20): 83-85.

[4] JIN C, LUO T, FU Z, et al, Chronic exposure of mice to low doses of imazalil induces hepatotoxicity at the physiological, biochemical, and levelstranscriptomic[J]. Environmental Toxicology, 2018, 33(6): 650-658.

[5] VALCKE M, BOURGAULT M H, ROCHETTE L, et al. Human health risk assessment on the consumption of fruits and vegetables containing residual pesticides: A cancer and non-cancer risk/benefit perspective[J]. Environ International, 2017, 108: 63-74.

[6] 中华人民共和国农业农村部. 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. National food safety standard —Maximum residue limits of pesticides in food: GB 2763-2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019.

[7] 谢建军, 陈捷, 李菊, 等. 改良QuEChERS法结合气相色谱串联质谱测定果蔬中20种杀菌剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 82-88.
XIE J, CHEN J, LI J, et al. Determination of 20 fungicides in fruits and vegetables by improved QuEChERS method combined with gas chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2013, 4(1): 82-88.

[8] 潘新明, 潘守奇, 于金玲, 等. 气相色谱法同时检测蔬菜中的7种不同性质农药残留[J]. 现代仪器, 2012, 18(2): 37-38.
PAN X, PAN S, YU J, et al. Simultaneous determination of seven pesticide residues in vegetables by gas chromatography[J]. Modern Instrument, 2012, 18(2): 37-38.

[9] LEHOTAY S J, DE KOK A, HIEMSTRA M, et al. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection[J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(2): 595-614.

[10] DANIEL D, LAGO C LDO. Determination of multiclass pesticides residues in corn by QuEChERS and capillary electrophoresis tandem mass spectrometry[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(7): 1684-1692.

[11] ZHAO H, HASI W, LI N, et al. In situ analysis of pesticide residues on the surface of agricultural products via surface-enhanced Raman spectroscopy using a flexible Au@Ag - PDMS substrate[J]. New Journal of Chemistry, 2019, 43(33): 13075-13082.

[12] 郭晓湲, 排尔哈提・亚生, 刘晨阳, 等. 拉曼光谱技术的发展及其在生物医学领域中的应用[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2021, 49(1): 135-142.
GUO X, PAIERHATI Y, LIU C, et al. Development of Raman spectroscopy and its application in biomedical field[J]. Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition), 2021, 49 (1): 135-142.

[13] 袁雯雯, 沈健. 表面增强拉曼光谱定量分析技术几种方法的探讨[J]. 化学世界, 2021, 62(4): 193-200.
YUAN W, SHEN J. Discussion on several methods for quantitative analysis of surface enhanced Raman spec-

troscopy[J]. Chemical World, 2021, 62 (4): 193-200.

[14] DEVAL V, KUMAR A, GUPTA V, et al. Molecular structure (monomeric and dimeric) and hydrogen bonds in 5-benzyl 2-thiohydantoin studied by FT-IR and FT-Raman spectroscopy and DFT calculations[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2014, 132: 15-26.

[15] 郭红青, 刘木华, 袁海超, 等. 表面增强拉曼光谱技术快速检测鸭肉中的土霉素[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 169-176.
GUO H, LIU M, YUAN H, et al. Rapid detection of oxytetracycline in duck meat by surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2017, 8 (1): 169-176.

[16] 黄双根, 王晓, 吴燕, 等. SERS技术的小白菜中西维因农药残留检测[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(1): 130-136.
HUANG S, WANG X, WU Y, et al. Determination of carbaryl pesticide residues in Chinese cabbage by SERS[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2019, 39 (1): 130-136.

[17] 王婷, 刘木华, 袁海超, 等. 鸡肉中丙酸睾酮残留表面增强拉曼光谱检测条件的优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(2):1 35-139, 164.
WANG T, LIU M, YUAN H, et al. Optimization of surface enhanced Raman spectroscopy for the determination of testosterone propionate residue in chicken[J]. Food Research and Development, 2020, 41(2): 135-139, 164.

[18] ALEXANDER K D, HAMPTON M J, ZHANG S, et al. A high-throughput method for controlled hot-spot fabrication in SERS-active gold nanoparticle dimer arrays[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2009, 40(12): 2171-2175.

[19] 朱越洲, 张月皎, 李剑锋, 等. 表面增强拉曼光谱:应用和发展[J]. 应用化学, 2018, 35(9): 984-992.
ZHU Y, ZHANG Y, LI J, et al. Surface enhanced Raman spectroscopy: Application and development[J]. Applied Chemistry, 2018, 35 (9): 984-992.

[20] XIE L, LU J, CHEN G, et al. Key role of direct adsorption on SERS Sensitivity: Synergistic effect among target, aggregating agent, and surface with Au or Ag colloid as SERS substrate[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2020, 11(3): 1022-1029.

[21] GUO H, HUANG Q, LENG W, et al, Bromide ion-functionalized nanoprobes for sensitive and reliable pH measurement by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Analyst (London), 2019, 144(24): 7326-7335.

[22] YASEEN T, SUN D, PU H, et al. Detection of omethoate residues in peach with surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Food Analytical Methods, 2018, 11 (9): 2518-2527.

[23] 第五鹏瑶, 卞希慧, 王姿方, 等. 光谱预处理方法选择研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(9): 2800-2806.
DIWU P, BIAN X, WANG Z, et al. Selection of spectral pretreatment methods[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2019, 39 (9): 2800-2806.

[24] 李淑娟, 卞希慧, 李倩, 等. 基于近红外光谱的四元调和食用油定量分析[J]. 天津科技大学学报, 2018, 33 (3): 18-24.
LI S, BIAN X, LI Q, et al. Quantitative analysis of four element mixed edible oil based on NIR [J]. Journal of Tianjin University of Science and Technology, 2018, 33 (3): 18-24.

[25] 徐夕博, 吕建树, 吴泉源, 等. 基于PCA-MLR和PCA-BPN的莱州湾南岸滨海平原土壤有机质高光谱预测研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(8): 2556-2562.
XU X, LYU J, WU Q, et al. Hyperspectral prediction of soil organic matter in coastal plain of the South Bank of Laizhou Bay based on PCA MLR and PCA BPN[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38 (8): 2556-2562.

Rapid Detection of Imazalil Residues in Navel Orange Peel Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

ZHANG Sha[1,2], LIU Muhua[1,2], CHEN Jinyin[2], ZHAO Jinhui[1,2*]

（1. *College of Engineering*, *Jiangxi Agricultural University*/*Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment in Jiangxi Province*, *Nanchang* 330045, *China*; 2. *Jiangxi Provincial Collaborative Innovation Center of Key Technologies and Quality and Safety in Post-Harvest Processing of Fruits and Vegetables*, *Nanchang* 330045, *China*）

Abstract: Imazalil, a preservative for navel orange in the process of postharvest processing, is easy to seep into the flesh through the peel and produce residues in the flesh, which is vulnerable to cause endanger to human body if it was eaten accidentally. Base on this, a fast detection method of imazalil residues in navel orange peel ,namely surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) was proposed in this study. Firstly, the SERS detection conditions of imazalil residues in navel orange peel were optimized, and the optimal detection conditions were determined as follows: Reaction time of 2 min, gold colloid of 400 μL, NaBr as electrolyte solution, NaBr dosage of 25 μL. Based on the above optimal conditions, 6 groups of spectral data processed by adaptive iterative penalized least squares (air PLS), air PLS combination with normalization, air PLS combination with baseline correction, air PLS combination with first derivative, air PLS combination with standard normal distribution (SNV), air PLS combination with multiplicative scatter correction (MSC) were used to establish support vector regression (SVR) models and compare the models prediction performance. And air PLS method was selected as the spectral pretreatment method, because the value of correlation coefficient computed value of prediction set (R_p) is the largest, and the value of root mean square error calculated value of the prediction set (RMSEP) is the smallest. Then, principal component analysis (PCA) was used to extract the features from spectral data, and the first seven principal component scores were selected as the input values of SVR prediction model. SVR, multiple linear regression (MLR) and partial least squares regression (PLSR) were used to analyze and compare the prediction performances. The R_p value of prediction set of SVR prediction model could reach 0.9156, the RMSEP value of their prediction set was 4.8407 mg/kg, and the relative standard deviation computation value (RPD) was 2.3103, which indicated that the closer the predicted value of imazalil residue on navel orange surface based on SVR algorithm was to the measured value, the more effective the prediction accuracy of the model could be. The above data indicated that the speedy detection of imazalil residues in navel orange peel could be emploied by SERS coupled with PCA and SVR modeling method.

Key words: navel orange; imazalil; surface-enhanced Raman spectroscopy; support vector regression; multiple linear regression; partial least squares regression